

2J

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

⑪ N° de publication : 2 744 133  
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national : 96 01056

⑬ Int Cl<sup>6</sup> : C 12 N 5/06, C 12 N 5/08, A 61 K 48/00, 38/18, 38/39, A 61 F 2/02, A 61 K 9/107

⑭ DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

⑮ Date de dépôt : 30.01.96.

⑯ Priorité :

⑰ Demandeur(s) : IMEDEX SOCIETE ANONYME — FR  
et LABORATOIRE HEMERIS SARL — FR.

⑱ Inventeur(s) : SOUVIGNET CLAUDE, PLUMAS  
MARTY BEATRICE et TAYOT JEAN LOUIS.

⑲ Date de la mise à disposition du public de la demande : 01.08.97 Bulletin 97/31.

⑳ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

㉑ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

㉒ Titulaire(s) :

㉓ Mandataire : BREESE MAJEROWICZ.

㉔ PROCÉDE DE CULTURE DE CELLULES A POTENTIEL ANGIOGENIQUE POUR INDUIRE LA MORPHOGENESE VASCULAIRE DESDITES CELLULES, MODELES IN VITRO DE MORPHOGENESE VASCULAIRE AINSI OBTENUS, ET LEURS APPLICATIONS NOTAMMENT AU CRIBLAGE DE DROGUES.

㉕ La présente invention concerne un procédé de culture de cellules à potentiel angiogénique pour induire la morphogénèse vasculaire desdites cellules, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à: (a) obtenir une préparation cellulaire contenant des cellules à potentiel angiogénique; (b) mettre en contact ces cellules avec un gel de collagène comprenant du collagène de type III ou constitué exclusivement de collagène de type III, en présence d'un milieu de culture adapté auxdites cellules; (c) laisser les cellules se développer dans le gel de collagène pendant une durée suffisante pour permettre la morphogénèse vasculaire.

L'invention concerne aussi des modèles in vitro de morphogénèse vasculaire et leurs applications notamment au criblage de drogues et au diagnostic de pathologies à composante vasculaire chez l'homme et l'animal.

FR 2 744 133 - A1



1

PROCÉDÉ DE CULTURE DE CELLULES À POTENTIEL  
ANGIOGÉNIQUE POUR INDUIRE LA MORPHOGÉNÈSE VASCULAIRE  
DESDITES CELLULES, MODÈLES IN VITRO DE MORPHOGÉNÈSE  
VASCULAIRE AINSI OBTENUS, ET LEURS APPLICATIONS NOTAMMENT  
AU CRIBLAGE DE DROGUES.

5

La présente invention concerne le domaine de  
la culture cellulaire et plus particulièrement un procédé  
de culture de cellules à potentiel angiogénique pour  
induire la morphogénèse vasculaire de ces cellules. La  
morphogénèse vasculaire est définie comme l'ensemble des  
événements cellulaires et tissulaires permettant la  
formation des vaisseaux sanguins (Risau, W.  
"Differentiation of the endothelium". *Faseb. J.*, 1995, 6-  
933) :

10

15

- soit à partir de cellules indifférenciées (angioblastes), il s'agit alors de la vasculogénèse,
- soit à partir de vaisseaux préformés, et il s'agit alors de l'angiogénèse.

20

25

30

La vasculogénèse est essentiellement un phénomène embryonnaire alors que l'angiogénèse apparaît non seulement durant l'embryogénèse, mais également durant la vie adulte. Cette angiogénèse tardive répond à des processus physiologiques, tels que la cicatrisation tissulaire ou la régénération endométriale, ainsi qu'à des phénomènes pathologiques, lors par exemple de complications dégénératives du diabète insulino-dépendant, de rhumatismes inflammatoires chroniques, d'une progression tumorale ou d'une endométriose. L'inhibition de l'angiogénèse est donc un objectif thérapeutique dans ces pathologies, alors qu'au contraire, l'induction de l'angiogénèse est recherchée dans la cicatrisation tissulaire, la greffe de peau ou la re-vascularisation post-ischémique (Battegay, E. J. "Angiogenesis :

En outre, les informations recueillies grâce à ce modèle aviaire ne sont pas directement transposables à l'homme.

5 L'utilisation de modèles animaux est rendue difficile par la variabilité inter-individus limitant les possibilités de standardisation, et par la mise en oeuvre de manipulations lourdes peu automatisables. En outre, la question de la spécificité d'espèce des effets observés est toujours soulevée, dès que le modèle s'éloigne du modèle mammifère. Enfin, la mise en place de  
10 réglementations visant à limiter l'usage d'animaux dans l'expérimentation cosmétique et pharmaceutique, n'est pas favorable aux développements de ce type de modèle.

15 Les modèles *in vitro* utilisent la capacité de cellules en culture de former des structures tubulaires centrées sur un espace luminal représentatif de la lumière physiologique des vaisseaux de l'appareil circulatoire. De tels modèles sont par exemple :

20 - Les gels tridimensionnels de collagène I (Montesano, R., L. Orci, "Phorbol ester induces angiogenesis *in vitro* from large vessel endothelial cell". *J. Cell. Physiol.*, 1987, 139, 284-291) (Montesano, R., L. Orci, "Tumor-promoting phorbol ester induces angiogenesis *in vitro*", *Cell*, 1985, 42, 469-477). Ce modèle permet de  
25 cultiver des cellules d'une lignée aortique de boeuf à la surface d'un gel formé de collagène purifié de type I en présence d'effecteurs de différenciation cellulaire tel que le phorbol myristyl acétate (PMA). Ces cellules induisent la formation de cordes cellulaires qui parfois  
30 envahissent le gel sous-jacent pour former de véritables tubules dans l'épaisseur du gel. Ce modèle est limité à l'utilisation de quelques lignées cellulaires très particulières ayant le potentiel de former des structures tubulaires différenciées. L'inducteur de différenciation  
35 le plus démonstratif dans ce modèle est un ester de

Mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects". *J. Mol. Med.*, 1995, 333-346).

Ces perspectives thérapeutiques nécessitent de disposer de modèles *in vivo* ou *in vitro* permettant le criblage de substances capables d'inhiber ou, au contraire, d'induire l'angiogénèse. On connaît dans l'art antérieur de tels modèles, parmi lesquels on peut distinguer les modèles animaux et les modèles *in vitro*.

Les modèles animaux permettent l'exploration à la fois des mécanismes directs et indirects de l'angiogénèse. De tels modèles sont par exemple les suivants :

- La néovascularisation de la cornée d'oeil de lapin (Hendkin, P. "Ocular neovascularization. The Kril memorial lecture". *Am. J. Ophthalmol.*, 1978, 85, 287-301). Dans ce modèle, la cornée est normalement vascularisée et un traumatisme chimique ou physique induit la formation de néo-vaisseaux capillaires. Ce modèle animal est limité par les complexités de manipulation, notamment la standardisation du traumatisme, le coût et les difficultés de l'expérience puisque un lapin est nécessaire pour chaque test. En outre, son emploi est soumis aux réglementations sur l'expérimentation animale.

- La membrane d'oeuf de poule embryonné (Sorgente, N., K. E. Kuetter, L. W. Soble, "The resistance of certain tissues to invasion". *Lab. Invest.*, 1975, 32, 217-222). Il s'agit d'un modèle traditionnel de l'embryologie selon lequel la formation rapide d'un réseau vasculaire durant la phase initiale de l'embryogénèse permet l'analyse des effets inhibiteurs de l'angiogénèse. Bien que le matériel mis en oeuvre dans ce modèle soit peu coûteux et non soumis à une réglementation contraignante, il est de manipulation délicate et non automatisable.

phorbol, le PMA, qui est un promoteur tumoral non physiologique, alors que les inducteurs physiologiques, comme le FGF (fibroblast growth factor), ont des effets dont la reproductibilité interlaboratoire n'est pas satisfaisante. La notion de structures tubulaires tri-dimensionnelles, qui est un élément crucial des phénomènes de morphogénèse vasculaire, est toujours discutable dans ce modèle où l'envahissement du gel par les tubules néo-formés reste très peu profond, et où seul un expérimentateur averti peut clairement différencier les cordes cellulaires formées à la surface du gel, des tubules très légèrement sous-jacents. En conséquence, une simple photographie de la culture en microscopie inversée ne permet pas d'affirmer avec certitude l'envahissement du gel, et seule la technique lourde d'analyse histologique du gel en coupes sériées peut apporter la preuve de l'envahissement du gel par les formations tubulaires.

- Le gel de matrice EHS. Il s'agit de matrice extracellulaire qui est sécrétée par une tumeur EHS de souris et dont la composition a été initialement décrite par H. K. Kleinman (Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, L. A. Liotta, P. G. Robey, K. Tryggvason, G. R. Martin, "Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin and heparin sulfate proteoglycan from EHS sarcoma". *Biochemistry*, 1982, 21, 6188-6193). Cette matrice est purifiée par un procédé non dénaturant pour servir de support tri-dimensionnel de culture cellulaire. Les cellules à potentiel vasculaire forment en quelques heures à la surface de ce gel des structures en réseau assimilées à des structures vasculaires. La rapidité des phénomènes fait admettre aux spécialistes du domaine qu'il s'agit plus d'un phénomène de migration et d'organisation cellulaire, que d'une véritable différenciation fonctionnelle. De plus, des cellules non programmées pour former *in vivo* des néo-capillaires, donnent dans ce

modèle, des structures en réseau comparables à celles obtenues avec des cellules vasculaires. La spécificité vasculaire des phénomènes observés dans ce modèle n'est donc pas admise de façon générale. Ce produit est d'ailleurs commercialisé dans diverses applications de recherche, autres que l'étude des phénomènes angiogéniques.

- Les lignées de cellules embryonnaires de souris. Les cellules du stroma précoce de l'embryon de souris, désignées dans la littérature par cellules ES, forment des corps embryonnaires après culture *in vitro* dans des conditions appropriées. Ces corps embryonnaires sont capables de former des kystes pleins dont les cellules de la coque externe expriment certains caractères de différenciation angiogénique de type vasculaire, désignés corps embryonnaires vasculaires (Wang, R., R. Clark., V. L. Bautch, "Embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies form vascular channels : an *in vitro* model of blood vessel development", *Development* 1992, 114, 303-316). Ce modèle explore les phases très initiales de la vasculogénèse embryonnaire. En effet, bien que l'amorce de canaux vasculaires existe dans ce modèle, ces structures restent à l'intérieur du corps embryonnaire et ne poursuivent pas leur développement. Il s'agit donc exclusivement d'un phénomène de vasculogénèse.

La multiplication des modèles *in vitro* témoigne de la difficulté de définir un modèle général, simple d'emploi et reproductible. En effet, comme indiqué pour chacun des exemples de l'art antérieur rappelés ci-dessus, l'organisation tri-dimensionnelle des structures vasculaires néo-formées est difficile à démontrer. En outre, les phénomènes observés avec les modèles existants ne sont représentatifs que de certaines étapes du processus complexe qui s'enchaînent selon une chronologie précise pour permettre la formation d'un néo-capillaire.

Ainsi, l'intérêt de la diversité des modèles existants repose sur leur complémentarité, chaque modèle étant adapté à l'étude de certains aspects seulement de l'angiogénèse; or cette diversité n'est pas compatible avec une utilisation industrielle facile.

Le but de la présente invention est précisément d'offrir un modèle couvrant les deux grandes phases de la morphogénèse vasculaire, la vasculogénèse, c'est à dire la formation de néo-vaisseaux à partir de cellules indifférenciées, et l'angiogénèse, c'est à dire l'extension vasculaire à partir de néo-vaisseaux pré-formés. Un but supplémentaire de la présente invention, qui n'est réalisé par aucun des modèles de l'art antérieur, est de pouvoir distinguer aisément, la multiplication cellulaire, la migration avec envahissement du tissu avoisinant, la tubulisation avec formation d'une lumière interne, le bourgeonnement avec formation de structures secondaires.

Ces buts sont atteints grâce à un procédé de culture de cellules à potentiel angiogénique, général, simple d'emploi et reproductible, permettant d'induire la morphogénèse vasculaire desdites cellules, comprenant les étapes consistant à :

- (a) obtenir une préparation cellulaire contenant des cellules à potentiel angiogénique;

- (b) mettre en contact ces cellules avec un gel de collagène comprenant du collagène de type III ou constitué exclusivement de collagène de type III, en présence d'un milieu de culture adapté auxdites cellules;

- (c) laisser les cellules se développer dans le gel de collagène pendant une durée suffisante pour permettre la morphogénèse vasculaire.

Le gel de collagène mis en oeuvre à l'étape (b) est constitué de collagène des types I et III; selon

une forme de réalisation préférée, il comprend entre environ 15 et 100 %, et avantageusement entre 30 et 100 %, de collagène de type III.

5 La préparation de gels de collagène de ces types sont notamment décrit dans les demandes de brevet européen publiées sous les numéros 214 035, 242 270, 667 332. D'autres collagènes de ces types sont disponibles commercialement.

10 Il peut s'agir de collagènes humains ou d'origine animale, obtenus de placenta.

15 Les cellules à potentiel angiogénique envisagées dans le cadre de l'invention sont plus particulièrement choisies parmi des cellules d'une lignée de cellules souches embryonnaires de mammifère, des cellules de tératocarcinome, des cellules tumorales, ou tout autre type de cellules présentant un potentiel angiogénique comme des cellules ayant acquis par modification génétique ce potentiel angiogénique.

20 A titre d'exemple spécifique de cellules d'une lignée de cellules souches embryonnaires de mammifère, on peut citer des cellules ES de souris, telle que la lignée D3 dérivée de blastocystes de souris (ATCC CRL 1934).

25 Indépendamment du milieu de culture adapté aux cellules cultivée de l'étape (b) et qui est un milieu classique que l'homme du métier est à même de déterminer selon la nature des cellules mises en oeuvre, la Demanderesse a observé que l'adjonction à ladite étape (b) 30 d'un ou plusieurs facteurs de croissance, par exemple incorporés au gel de collagène, et plus particulièrement de FGF (fibroblast growth factor) et surtout de VEGF (vascular endothelial growth factor) ou d'un mélange de FGF 35 et de VEGF, permet de doubler environ le nombre de corps

embryonnaires, de favoriser et d'accélérer la formation des structures tubulaires.

5 Le procédé de l'invention défini ci-dessus permet d'induire chez des cellules à potentiel angiogénique un effet cellulaire surprenant, en effet, si le potentiel vasculaire des corps embryonnaires était connu, la révélation de l'expression *in vitro* de ce potentiel de différenciation est remarquable. Ce procédé  
10 permet de disposer d'un nouveau modèle de morphogénèse vasculaire assurant l'exploration distincte au cours de l'étape (c) lors d'une même expérimentation des deux phases représentatives de la morphogénèse vasculaire :

15 - la formation de troncs initiaux à partir de corps embryonnaires, laquelle est le reflet de la vasculogénèse,

20 - la formation de tubules secondaires au niveau des fourches de division des tubules primaires, laquelle est le reflet d'un bourgeonnement caractéristique de l'angiogénèse.

L'invention concerne donc aussi un modèle *in vitro* de morphogénèse vasculaire, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules à potentiel angiogénique incluses dans un gel de collagène comprenant du collagène de type  
25 III ou constitué exclusivement de collagène de type III, dans un milieu de culture adapté auxdites cellules. Ce gel de collagène est avantageusement constitué de collagène des types I et III d'origine placentaire, et selon une forme de réalisation préférée, il comprend entre environ 5  
30 et 100 % de collagène de type III.

Selon une forme de réalisation particulière, et indépendamment du milieu de culture adapté aux  
35 cellules, le modèle de l'invention comprend également un ou plusieurs facteurs de croissance. Des facteurs de

croissances préférés sont le FGF mais surtout le VEGF, ou un mélange de FGF et de VEGF.

Conformément au procédé défini précédemment, on préfère, dans le modèle de l'invention, que

5                   - le gel de collagène soit constitué de collagène des types I et III, et dans ce cas comprenne entre environ 15 et 100 %, et avantageusement entre 30 et 100%, de collagène de type III.

10                   - les cellules à potentiel angiogénique soient choisies parmi des cellules d'une lignée de cellules souches embryonnaires de mammifère, des cellules de tératocarcinome, des cellules tumorales, ou tout autre type de cellules présentant un potentiel angiogénique comme des cellules ayant acquis par modification génétique  
15                   ce potentiel angiogénique. A titre d'exemple spécifique de cellules d'une lignée de cellules souches embryonnaires de mammifère, on peut citer des cellules ES de souris, telle que la lignée D3 dérivée de blastocystes de souris (ATCC CRL 1934).

20                   En raison de leur simplicité, le procédé de l'invention et le modèle qui y est associé, précédemment décrits, sont particulièrement adaptés au criblage industriel de médicament sur la base de leurs propriétés  
25                   pro ou anti vasculaires. En outre, ils donnent la possibilité d'étudier le développement vasculaire, mais également les dysfonctionnements vasculaires, en utilisant par exemple des anticorps neutralisants ou des sondes oligonucléotidiques anti-sens.

30                   En effet, la mise en oeuvre du procédé de l'invention avec des molécules, notamment dont l'activité est inconnue, permet de sélectionner celles qui présenteraient une propriété de modulation des phénomènes de vasculogénèse ou d'angiogénèse. De telles molécules  
35                   auraient un intérêt pharmacologique majeur dans de

5 multiples pathologies tant humaines que animales impliquant un dysfonctionnement vasculaire, comme des complications dégénératives du diabète, des rhumatismes inflammatoires articulaires, la progression tumorale et métastatique.

10 En conséquence, l'invention concerne aussi un procédé de criblage de substances susceptibles de favoriser ou inhiber la morphogénèse vasculaire mettant en oeuvre un procédé de culture de cellules à potentiel angiogénique décrit précédemment, caractérisé en ce que l'on introduit la substance à tester à l'une au moins des étapes (a) à (c) de ce procédé, et en ce que l'on mesure par tout moyen approprié la présence ou l'absence de morphogénèse vasculaire.

15 La mise en oeuvre de ce procédé de criblage peut être avantageusement réalisée grâce à une trousse comprenant au moins un compartiment protégé renfermant un modèle de l'invention décrit précédemment, ou une ou plusieurs séries de compartiments protégés, chaque série comprenant un compartiment renfermant un gel de collagène et au moins un des compartiments suivants :

- un compartiment renfermant des cellules à potentiel angiogénique,

25 - un compartiment renfermant un milieu de culture adaptée auxdites cellules;

- un compartiment renfermant un ou plusieurs facteurs de croissance.

30 Outre, l'application du procédé de l'invention au criblage de drogues, celui trouve des applications dans le domaine du diagnostic, chez l'homme ou l'animal, du potentiel métastatique d'une tumeur et de pathologies à composante vasculaire.

35 En effet, la vascularisation d'une tumeur est souvent corrélée à son potentiel métastatique. En

conséquence, la mesure du potentiel angiogénique selon le procédé de l'invention permet de pronostiquer la gravité de la tumeur. En cancérologie clinique, l'établissement d'un pronostic de gravité d'une tumeur maligne solide pourrait être alors amélioré par la prise en compte du pouvoir angiogénique de la tumeur. Actuellement des tests cytologiques sont réalisés pour mesurer le développement du réseau vasculaire intra-tumoral mais aucun test fonctionnel n'existe.

L'invention concerne donc aussi un procédé de diagnostic du potentiel métastatique d'une tumeur chez un patient mettant en oeuvre un procédé de culture de cellules à potentiel angiogénique décrit précédemment, caractérisé en ce que les cellules à potentiel angiogénique incluses dans le gel de collagène sont des cellules tumorales prélevées chez ledit patient.

La mise en oeuvre de ce procédé diagnostique du potentiel métastatique d'une tumeur peut être avantageusement réalisée grâce à une trousse comprenant une ou plusieurs séries de compartiments protégés, chaque série comprenant un compartiment renfermant un gel de collagène et au moins un des compartiments suivants :

- un compartiment renfermant un milieu de culture adaptée auxdites cellules;

- un compartiment renfermant un ou plusieurs facteurs de croissance;

- un compartiment dans lequel seront placées des cellules tumorales prélevées chez ledit patient.

Les pathologies à composante vasculaire, telles que des diabètes, des rhumatismes, l'endométriose et des cancers engendrent la présence dans les fluides biologiques de facteurs angiogéniques, comme le FGF ou le VEGF, susceptibles de constituer des marqueurs du développement de la maladie. L'invention concerne donc

encore un procédé de diagnostic d'une pathologie à  
composante vasculaire chez un patient mettant en oeuvre un  
procédé de culture de cellules à potentiel angiogénique  
décrit précédemment, caractérisé en ce qu'à l'une au moins  
5 des étapes (a) à (c), on ajoute un échantillon biologique  
prélevé dudit patient et susceptible de contenir des  
facteurs angiogéniques capables de favoriser la  
morphogénèse vasculaire. Les échantillons biologiques sur  
lesquels peuvent être pratiqués ce diagnostic sont  
10 notamment le sérum, l'urine, le liquide céphalo-rachidien,  
le plasma, etc...

La mise en oeuvre de ce procédé de  
diagnostic de pathologies à composante vasculaire chez un  
patient peut être avantageusement réalisée grâce à une  
15 trousse comprenant au moins un compartiment protégé  
renfermant un modèle de l'invention décrit précédemment,  
ou une ou plusieurs séries de compartiments protégés,  
chaque série comprenant un compartiment renfermant un gel  
de collagène, et au moins un des compartiments suivants :

20 - un compartiment renfermant des cellules à  
potentiel angiogénique,

- un compartiment renfermant un milieu de  
culture adaptée auxdites cellules;

25 - un compartiment dans lequel sera placée un  
échantillon biologique prélevé dudit patient.

Outre des applications au criblage de drogue  
et au diagnostic, le procédé de culture de cellules à  
potentiel angiogénique de l'invention, permet de préparer  
30 un biomatériau à base de collagène dans lequel sont  
incluses, selon le stade de l'étape (c), des cellules,  
soit à potentiel angiogénique, soit ayant plus ou moins  
déjà induit une différenciation vasculaire. L'invention se  
rapporte donc aussi à un biomatériau cellularisé constitué  
35 d'un gel de collagène comprenant du collagène de type III

ou constitué exclusivement de collagène de type III, dans lequel sont incluses des cellules à potentiel angiogénique ou des cellules ayant plus ou moins induit une différenciation vasculaire. Le biomatériau précédent peut en outre comprendre ou être imprégné d'un milieu de culture adapté aux cellules incorporées dans le gel de collagène. Avantageusement, le gel de collagène entrant dans la composition de ce biomatériau, est constitué de collagène des types I et III, et selon une forme de réalisation préférée, il comprend entre environ 15 et 100 % et avantageusement entre 30 et 100 %, de collagène de type III. Il peut s'agir de collagènes humains ou d'origine animale, obtenus de placenta.

Les cellules entrant dans la composition de ce biomatériau peuvent, en outre, avoir été, préalablement à leur inclusion dans le gel de collagène, génétiquement modifiées pour produire des principes actifs thérapeutiques, comme des facteurs de croissance.

Ce biomatériau peut encore conformément au procédé de l'invention être imprégné d'au moins un facteur de croissance, tel que le VEGF et/ou le FGF..

Un biomatériau conforme à l'invention est utile comme implant cellularisé pour remplacer ou compenser la vascularisation défectueuse d'un organe, ou encore dans une stratégie de thérapie cellulaire, pour permettre la production *in vivo* d'un principe actif thérapeutique.

Une application de l'invention, proche de la précédente, consiste à mettre en oeuvre dans un organisme, à titre d'implant colonisable par des cellules, un biomatériau constitué d'un gel de collagène comprenant du collagène de type III ou constitué exclusivement de collagène de type III, imprégné d'au moins un facteur de croissance, de préférence choisi parmi le FGF et le VEGF.

Comme pour le biomatériau précédemment, il comprend, selon une forme de réalisation préférée, entre environ 15 et 100 % et avantageusement entre 30 et 100 %, de collagène de type III. Il peut s'agir de collagènes humains ou d'origine animale, obtenus de placenta. Ce biomatériau est particulièrement utile comme implant colonisable *in vivo*, dans l'organisme d'un sujet humain ou animal, par des cellules dudit organisme. Ce biomatériau peut alors comprendre outre le gel de collagène et le(s) facteur(s) de croissance, un milieu adapté, voir sélectif, favorisant sa colonisation par un ou plusieurs types cellulaires de l'organisme.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent donnés à titre non limitatifs et se référant aux dessins en annexe, dans lesquels les figures 1 et 2 représentent des photos, en microscopie inversée, de corps embryonnaires vascularisés obtenus avec le procédé de l'invention.

#### I - Culture de cellules ES indifférenciées.

Les cellules ES de la lignée D3 dérivée de blastocystes de souris (ATCC CRL 1934) sont cultivées dans des boîtes de culture 100 mm (Costar, Cambridge, Ma, USA, réf. 3100) recouvertes de gélatine 0,2 % (Sigma, Saint Louis, Mi, USA M17353)

Le milieu de culture est constitué de milieu "Dubelco Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose (Gibco 41965-039) additionné de 15 % de sérum de veau foetal (FCS, Gibco, Grand Island, NY, USA), de pyruvate de sodium 1 mM (Gibco 1136-039), d'acides aminés non essentiels 0,1 mM (Gibco 11140-035), de L-Glutamine 2 mM (Gibco 25030-032), de mono-thio-glycérol 150 mM (Sigma,

Saint Louis, Mi, USA M17353) et d'un mélange de pénicilline-streptomycine 100 µg/ml (Gibco 15140-030).

Les cellules sont maintenues sous forme indifférenciées par ajout de LIF recombinant humain (leukemia inhibiting factor) 1000 u/ml (Schmitt, R., M. Bruyns, H. R. Snodgrass, "Hematopoetic development of embryonic stem cells in vitro : cytokin and receptor gene expression". *Genes Dev.*, 1991, 5, 728-740). Le milieu de culture additionné de LIF est renouvelé tous les jours.

Sous ces conditions, 95% de la population de cellules ES est dans un état indifférencié clairement visible en microscopie à contraste de phase. Un stock de plusieurs dizaines de cryotubes contenant 5 millions de cellules ES provenant du même passage a été préparé à l'avance.

Ce protocole expérimental permet bien entendu un grand nombre de variantes à la portée de l'homme du métier à partir de l'enseignement de cet exemple. Il est possible notamment de remplacer le LIF par tout autre inhibiteur de la différenciation, comme l'Oncostatin M.

## II - Expériences de différenciation.

Une ampoule de cellule D3 est décongelée puis mise en culture comme indiquée ci-dessus. Après deux jours de culture, les cellules sont subconfluentes. Elles sont alors décollées par une solution de trypsine 0,25 % (Gibco) dans du tampon salin (PBS) contenant 1 mM d'EDTA, puis ensemencées à raison de 5 millions de cellules par boîte durant 24 heures. Trois heures avant l'induction de la différenciation, le milieu contenant du LIF est renouvelé.

Après trypsination, la différenciation est réalisée dans des boîtes de culture bactériologiques (35/10 mm) (Greiner, 627102). Sont mélangés par boîte :

- 500 µl d'une solution de collagène I+III préparé à partir de placenta humain (50 % de chacun des deux types de collagène),
- 250 µl de milieu Iscove Medium Dulbecco Modified (IMDM) deux fois concentré (Gibco 42200-014),
- 750 µl d'une solution de différenciation deux fois concentré (SD) contenant de la transferrine 300 mg (Boehringer Mannheim 652202), de l'insuline 10 mg/ml (Boehringer 977420), du mono-thio-glycérol 450 mM, 15 % de sérum de veau foetal (FCS, Gibco, Grand Island, NY, USA) dans de l'ISCOVE Glutamax (Gibco 31980-022)
- 50 µl de suspension contenant au moins 500 cellules.

En contrôle, des inductions de différenciation sont réalisées en remplaçant la solution de collagène par de la méthyl-cellulose 1,1 % (Methocel high viscosity, Fluka A. G., Buchs, Suisse) selon la même technique.

Enfin, des essais sont également réalisés en utilisant comme support de culture, une solution de matrice Matrigel (EHS) (Collaborative Biomedical Product, Becton Dickinson) utilisée diluée au 1/2, additionnée du milieu SD et d'une solution d'IMDM tous deux concentrés deux fois.

Pour certains essais, les cytokines seules ou en mélange suivantes ont été incorporées au milieu de culture :

- VEGF recombinant humain à raison de 50 ng/ml (Pre protech 100-20),

- bFGF recombinant humain à raison de 100 ng/ml (R&D 233-FB-025).

Toutes les expériences rapportées ci-dessus ont été réalisées selon le même schéma, lequel constitue un exemple acceptant de nombreuses variantes à la portée de l'homme du métier à partir de l'enseignement de ce schéma. Notamment, des essais favorables ont été réalisés avec un gel de collagène constitué de collagène I+III comprenant 10 % de collagène III pour 90 % de collagène I.

Le collagène préféré est un collagène placentaire humain non dénaturé de type I+III préparé en solution à 3 mg/ml et dilué à 1 mg/ml en présence du milieu de culture qui élève son pH et le gélifie. Le gel ainsi obtenu en quelques heures est un gel semi-solide qui est facilement démoulable et séchable sur lame. La concentration en collagène doit bien entendu être adaptée pour disposer d'un gel ni trop liquide, ni trop solide ; à titre indicatif, la quantité de collagène peut être comprise entre 0,5 mg/ml et 20 mg/ml.

Les proportions de cellules par rapport à la quantité de collagène sont susceptibles d'admettre des variations par rapport au schéma rapporté ci-dessus. Des résultats concluant ont été obtenus avec des mélanges comprenant entre 500 à 1500 cellules pour environ 1,5 mg de collagène.

### III - Quantification du phénomène observé.

Les boîtes sont observées quotidiennement au microscope inversé et photographiées. Des comptages peuvent être réalisés afin d'évaluer le nombre de corps embryonnaires :

- ne présentant pas de structure vasculaire (CO),

- présentant une ou plusieurs structures tubulaires inférieures à son diamètre (C+),

- présentant un ensemble de tubules de longueur supérieure ou égale à son diamètre (C++).

5 Un pourcentage de vascularisation est ensuite obtenu en calculant le rapport :  $(C+)+(C++)$  / nombre total de corps embryonnaires par boîte.

10 IV - Coloration et immunofluorescence indirecte.

Occasionnellement, les gels sont séchés sur lame selon la méthode initialement décrite (Lanotte, M., "Terminal differentiation of hematopoietic cell clones cultured in tridimensional collagen matrix : in situ cell morphology and enzyme histochemistry analysis". *Biol. Cell.*, 1984, 50, 107-120), puis colorés au May Grünwald Giemsa (Biolyon, Unipath, Dardilly, France 09262 et 09766) selon les recommandations du fournisseur.

20 Les gels séchés peuvent également être fixés par une solution de paraformaldéhyde 3 % préparée dans du tampon phosphate salin (PBS) afin de permettre la réalisation d'un test d'immunofluorescence indirecte. Les lames sont ensuite mises en contact à 37 °C durant une

25 heure avec un anticorps monoclonal de rat dirigé contre une molécule marqueur des cellules vasculaires (PECAM pour Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, ou Facteur von Willebrand) (Risau, W., "Differentiation of the endothelium". *Faseb J.*, 1995, 6-933). Après plusieurs

30 lavages effectués en PBS, les lames sont incubées 30 minutes avec une solution contenant des fragments F(ab')<sub>2</sub> de sérum de chèvre dirigé contre les immunoglobulines G de rat diluée au 1/100 (Jackson ImmunoResearch, Immunotech, France) dans du PBS. Deux derniers lavages en PBS

permettent l'observation des lames au microscope à fluorescence.

#### V - Résultats.

5

La matrice Matrigel (EHS) additionnée ou non de facteurs de croissance ne permet pas l'obtention de corps embryonnaires (CE). En effet, les cellules ES ne s'associent pas en amas constitués de quelques cellules et ne forment pas de structures plus importantes. Elles ne peuvent pas être observées au microscope et doivent certainement mourir très rapidement.

15

20

25

30

35

La méthyl-cellulose additionnée ou non de facteurs de croissance permet la formation de CE en quelques jours. AU bout de trois jours, des amas cellulaires sont observés. Ces amas grossissent jusqu'à être visibles à l'oeil nu au bout de cinq jours. Les CE ainsi obtenus peuvent présenter des morphologies différentes selon qu'ils sont ou non entourés d'une coque cellulaire. Mais aucune structure vasculaire extérieure n'est observée avec ce support de culture. Ces résultats sont à rapprocher de plusieurs travaux antérieurs décrivant des canaux vasculaires confinés à l'intérieur des CE (Wang, R., R. Clark., V. L. Bautch, "Embryonic stem cell-derived cystic embryoïd bodies from vascular channels : an in vitro model of blood vessel development", *Development* 1992, 114, 303-316 ; Doetschman, T., A. Kier, J. D. Coffin, "Embryonic stem cells model systems for vasculogenesis and cardiac disorders". *Hypertension*, 1993, 22, 618-629). L'adjonction de facteurs de croissance permet de doubler le nombre de CE obtenus à partir de 1500 cellules ES indifférenciées (obtention de 50 CE au minimum par boîte en présence de facteurs de croissance).

De manière remarquable, le procédé de l'invention mettant en oeuvre un support de gel de collagène I+III permet la formation de CE présentant des structures tubulaires rayonnantes.

5 Les cellules ES indifférenciées incorporées à l'intérieur du gel de collagène I+III contenant la solution SD présentent le même aspect qu'en présence de méthyl cellulose durant les premiers jours de la culture. Mais, entre J5 et J8, les CE formés (une trentaine par  
10 boîte au minimum) voient leur taille augmenter. Au cours des jours suivants, certains d'entre eux présentent des structures tubulaires rayonnantes dont la longueur est la plupart du temps inférieure au diamètre du CE considéré. Le pourcentage de vascularisation peut néanmoins atteindre  
15 50 %. Ces structures tubulaires ne sont pas révélées en immunofluorescence par des anticorps monoclonaux dirigés contre des molécules marqueurs des cellules d'origine vasculaire.

L'addition de VEGF et de FGF favorise et  
20 accélère la différenciation des cellules ES en cellules endothéliales. Ainsi, lorsque du FGF, du VEGF ou un mélange de ceux-ci est incorporé au gel de collagène, des structures tubulaires commencent à se former dès j6. Le calcul du pourcentage de vascularisation a permis de  
25 montrer :

- qu'il existe bien un décalage d'apparition des structures tubulaires sans facteur de croissance par rapport aux conditions avec des facteurs de croissance,
- que le FGF et surtout le VEGF introduits  
30 individuellement sont suffisants à induire une tubulisation,
- que le FGF et le VEGF agissent en synergie puisque la condition réunissant ces deux facteurs donne les meilleurs résultats (75 % de vascularisation à J10).

Les expériences d'immunofluorescence ont clairement démontré le caractère vasculaire des structures tubulaires obtenues en présence de VEGF. Ce facteur semble particulièrement efficace pour induire la différenciation des cellules ES en cellules endothéliales exprimant les molécules PECAM mais également le facteur von Willebrand qui est un marqueur tardif de la différenciation endothéliale.

La photo de la figure 1 représente, en microscopie inversée, différents types de corps embryonnaires obtenus à J10 dans un gel de collagène supplémenté par du VEGF et du FGF. On observe sur cette photo, de la gauche vers le droite : un CE non vascularisé, un CE entouré de cellules ayant migré dans le gel, enfin un CE fortement vascularisé, c'est à dire, dont la longueur des tubules est supérieure au diamètre du corps et présentant des branchements secondaires, témoignant du processus d'angiogenèse.

La photo de la figure 2 représente, en microscopie inversée, un CE fortement vascularisé (branchements tertiaires) avec présence de nombreuses cellules intra-tubulaires probablement d'origine hématopoïétique.

## REVENDICATIONS

5                   1) Procédé de culture de cellules à  
potentiel angiogénique pour induire la morphogénèse  
vasculaire desdites cellules, caractérisé en ce qu'il  
comprend les étapes consistant à :

- (a) obtenir une préparation cellulaire  
contenant des cellules à potentiel angiogénique;
- 10                   - (b) mettre en contact ces cellules avec un  
gel de collagène comprenant du collagène de type III ou  
constitué exclusivement de collagène de type III, en  
présence d'un milieu de culture adapté auxdites cellules;
- 15                   - (c) laisser les cellules se développer  
dans le gel de collagène pendant une durée suffisante pour  
permettre la morphogénèse vasculaire.

20                   2) Procédé selon la revendication 1,  
caractérisé en ce que le gel de collagène est constitué de  
collagène des types I et III.

25                   3) Procédé selon l'une des revendications 1  
ou 2, caractérisé en ce que le gel de collagène comprend  
entre environ 15 et 100 %, et avantageusement entre 30 et  
100 %, de collagène de type III.

                  4) Procédé selon l'une quelconque des  
revendications précédentes, caractérisé en ce que le  
collagène est d'origine placentaire.

30                   5) Procédé de culture de cellules à  
potentiel angiogénique selon l'une quelconque des  
revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdites  
cellules sont choisies parmi :

- 35                   - des cellules d'une lignée de cellules  
souches embryonnaires de mammifère;

- des cellules de tératocarcinome à potentiel angiogénique;

- des cellules tumorales à potentiel angiogénique;

5 - des cellules ayant acquis par modification génétique un potentiel angiogénique.

6) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'à l'étape  
10 (b) on ajoute un ou plusieurs facteurs de croissance.

7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les facteurs de croissance ajoutés à l'étape (b) sont le bFGF ou le VEGF, ou un mélange de  
15 ceux-ci.

8) Modèle *in vitro* de morphogénèse vasculaire, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules à potentiel angiogénique incluses dans un gel de collagène  
20 comprenant du collagène de type III ou constitué exclusivement de collagène de type III, dans un milieu de culture adapté auxdites cellules, éventuellement additionné d'un ou plusieurs facteurs de croissance.

9) Modèle selon la revendication 8, caractérisé en ce que le gel de collagène est constitué de collagène des types I et III.  
25

10) Modèle selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que le gel de collagène comprend  
30 entre 5 et 100 % de collagène de type III.

11) Modèle selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que les cellules à potentiel angiogénique sont choisies parmi :  
35

- des cellules d'une lignée de cellules souches embryonnaires de mammifère;

- des cellules de tératocarcinome à potentiel angiogénique;

5                   - des cellules tumorales à potentiel angiogénique;

- des cellules ayant acquis par modification génétique un potentiel angiogénique.

10                   12) Procédé de criblage de substances susceptibles de favoriser ou inhiber la morphogénèse vasculaire mettant en oeuvre un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'on introduit la substance à tester à l'une au moins des  
15                   (a) à (c), et en ce que l'on mesure par tout moyen approprié la présence ou l'absence de morphogénèse vasculaire.

20                   13) Trousse de criblage de substances susceptibles de favoriser ou inhiber la morphogénèse vasculaire, pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un compartiment protégé renfermant un modèle selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, ou une ou  
25                   plusieurs séries de compartiments protégés, chaque série comprenant un compartiment renfermant un gel de collagène et au moins un des compartiments suivants :

- un compartiment renfermant des cellules à potentiel angiogénique,

30                   - un compartiment renfermant un milieu de culture adapté auxdites cellules;

- un compartiment renfermant un ou plusieurs facteurs de croissance.

14) Procédé de diagnostic du potentiel métastatique d'une tumeur chez un patient mettant en oeuvre un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les cellules à  
5 potentiel angiogénique incluses dans le gel de collagène sont des cellules tumorales prélevées chez ledit patient.

15) Trousse de diagnostic du potentiel métastatique d'une tumeur chez un patient pour la mise en  
10 oeuvre d'un procédé selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle comprend une ou plusieurs séries de compartiments protégés, chaque série comprenant un compartiment renfermant un gel de collagène et au moins un des compartiments suivants :

- 15 - un compartiment renfermant un milieu de culture adapté auxdites cellules;
- un compartiment renfermant un ou plusieurs facteurs de croissance;
- 20 - un compartiment dans lequel seront placées des cellules tumorales prélevées chez ledit patient.

15) Procédé de diagnostic d'une pathologie à composante vasculaire chez un patient mettant en oeuvre un  
25 procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'à l'une au moins des étapes (a) à (c), on ajoute un échantillon biologique prélevé dudit patient et susceptible de contenir des facteurs angiogéniques capables de favoriser la morphogénèse vasculaire.

30 17) Trousse de diagnostic d'une pathologie à composante vasculaire chez un patient pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un  
35 compartiment protégé renfermant un modèle selon l'une

quelconque des revendications 8 à 11, ou une ou plusieurs séries de compartiments protégés, chaque série comprenant un compartiment renfermant un gel de collagène et au moins un des compartiments suivants :

- 5                   - un compartiment renfermant des cellules à potentiel angiogénique,
- un compartiment renfermant un milieu de culture adapté auxdites cellules;
- un compartiment dans lequel sera placée un
- 10               échantillon biologique prélevé dudit patient.

18) Biomatériau pour la réalisation d'implants colonisables *in vivo* par les cellules d'un organisme, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un gel de collagène comprenant du collagène de type III ou

15               constitué exclusivement de collagène de type III, ledit gel étant imprégné d'au moins un facteur de croissance, de préférence choisi parmi le VEGF et le FGF.

19) Biomatériau selon la revendication 18, caractérisé en ce que ledit gel de collagène comprend entre environ 15 et 100 %, et avantageusement entre 30 et 100 %, de collagène de type III.

20

20) Biomatériau pour la réalisation d'implants, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un gel de collagène comprenant du collagène de type III ou

25               constitué exclusivement de collagène de type III dans lequel est inclus des cellules à potentiel angiogénique ou

30               des cellules ayant plus ou moins induit une différenciation vasculaire.

21) Biomatériau selon la revendication 20, caractérisé en ce que les cellules à potentiel angiogénique ou les cellules ayant plus ou moins induit

35

une différenciation vasculaire, sont génétiquement modifiées pour produire *in vivo* un principe actif thérapeutique.

5

22) Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 20 et 21, caractérisé en ce qu'il est imprégné d'au moins un facteurs de croissance, de préférence choisi parmi le VEGF et le FGF.

10

PL. 1/2

Fig. 1



2744133

PL. 2/2

Fig. 2



**INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE**

# RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

**2744133**

N° d'enregistrement  
national

FA 525722  
FR 9601056

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revenant à la demande
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	de la demande examinée
A	<p>EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 22, no. 8, Août 1992, OXFORD, GB, pages 504-515, XP000608428 R. MONTESANO: "REGULATION OF ANGIOGENESIS IN VITRO." * page 505, colonne de gauche, alinéa 2 - page 506, colonne de gauche, alinéa 1 * * page 512, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 1 *</p> <p>---</p>	1-11
A	<p>LABORATORY INVESTIGATION, vol. 64, no. 2, Février 1991, BALTIMORE, MD, US, pages 174-186, XP000608427 M.L. IRUELA-ARISPE ET AL.: "DIFFERENTIAL EXPRESSION OF EXTRACELLULAR PROTEINS IS CORRELATED WITH ANGIOGENESIS IN VITRO." * page 174, résumé *</p> <p>---</p>	1-11
A	<p>DEVELOPMENT, vol. 102, no. 3, 1988, CAMBRIDGE, GB, pages 471-478, XP000608395 W. RISAU ET AL.: "VASCULOGENESIS AND ANGIOGENESIS IN EMBRYONIC-STEM-CELL-DERIVED EMBRYOID BODIES." * page 471, résumé *</p> <p>---</p>	1-11
D,A	<p>HYPERTENSION, vol. 22, no. 4, Octobre 1993, DALLAS, TX, US, pages 618-629, XP000605449 T. DOETSCHMAN ET AL.: "EMBRYONIC STEM CELL MODEL SYSTEMS FOR VASCULAR MORPHOGENESIS AND CARDIAC DISORDERS." * page 624, colonne de droite, ligne 48 - page 626, colonne de droite, ligne 19 *</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-11
		<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.C.L.)</p> <p>C12N A61L G01N</p>
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
28 Octobre 1996		Ryckebosch, A
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'ensemble d'un motif une revendication ou autre-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie en principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>A : membre de la même famille, document correspondant</p>		

**INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE**

# RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

**2744133**

N° d'enregistrement  
national

FA 525722  
FR 9601056

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO-A-92 06179 (IMEDEX S.A. ET AL.) 16 Avril 1992 * le document en entier *	1-22
D,A	EP-A-0 242 270 (INSTITUT MERIEUX) 21 Octobre 1987 * le document en entier *	1-22
A	EP-A-0 080 956 (FONDATION MERIEUX ET AL.) 8 Juin 1983 * le document en entier *	1-22
		<b>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.C.L.G)</b>
<b>Date d'achèvement de la recherche</b> <b>28 Octobre 1996</b>		<b>Examineur</b> <b>Ryckebosch, A</b>
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'examen d'un motif une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intermédiaire T : théorie en principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant		